

Metode pengujian listeria monocytogenes



© BSN 1998

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

1	Pendahuluan	1
2	Media dan reagensia	1
3	Peralatan	2
4	Prosedur	3
	Lampiran A	7
	Bibliografi	9



Metode pengujian *Listeria monocytogenes*

1 Pendahuluan

Listeria monocytogenes adalah jenis bakteri gram positif berbentuk batang, tidak membentuk spora, dan mampu tumbuh pada media yang mengandung darah, asetat dan glukosa. *Listeria* lebih mudah diisolasi dari spesimen patologik jika jaringan disimpan pada suhu 4°C selama beberapa hari, sebelum diinokulasikan ke media bakteriologi. Organisme ini adalah fakultatif anaerob, dan katalase positif dan menghasilkan zona hemolisis pada lempeng darah.

Bakteri ini mempunyai biak pada suhu dingin, pada suhu beku tidak dapat rusak atau mati dan juga tidak begitu berpengaruh dengan adanya perubahan suhu. Mampu hidup menyebar di alam, pada umumnya hidup pada beberapa jenis sayuran, susu, es krim, daging maupun ikan.

Beberapa jenis *Listeria* dapat menyebabkan infeksi spontan pada binatang (piaraan maupun liar) dan pada manusia. Pada umumnya binatang pemamah biak *Listeria* dapat menyebabkan meningo ensefalitis, juga dapat menyebabkan kelahiran dini atau bahkan terjadinya aborsi.

Metode pengujian *Listeria* ini pada prinsipnya adalah pengamatan secara kualitatif kemungkinan terdapatnya *Listeria monocytogenes* pada suatu produk. Langkah-langkah pengamatan ini meliputi tahap-tahap pengkayaan, isolasi atau seleksi identifikasi, serologi dan uji CAMP.

2 Media dan reagensia

Media dan reagensia yang diperlukan adalah:

- 1) *acetic acid*, 5N;
- 2) *acriflavin HCL* (Sigma);
- 3) *agar* (Bacto difco);
- 4) *blood agar base No. 2*;
- 5) *cycloheximide* (Sigma);
- 6) *sheep blood, defibrinated*;
- 7) *ethanol absolute*;
- 8) *Enrichment Broth/EB*, (M.81);
- 9) *Flourescent Antibody (FA) buffer* (Difco);
- 10) *glysine anhydride* (Sigma);
- 11) reagen pewarnaan Gram;
- 12) KOH 40% (R 16);
- 13) larutan hidrogen peroksida, 3% (R.4);
- 14) *listeria-typing sera set* (Difco);
- 15) *lithium chloride* (Sigma);

- 16) *moxalactam* (sigma);
- 17) *nalidixic acid* (sodium salt) (sigma);
- 18) *physiological saline* 0,85 % (R.15);
- 19) *nutrient broth* (M 49);
- 20) *phenyl ethanol agar* (Difco);
- 21) *purple carbohydrate fermentation broth base* (M. 57);

Larutan mengandung 0,5% dekstrosa, esculin, maltosa, rhamnosa dan xylosa.

- 22) *SIM motility medium* (M 83);
- 23) *trypticase soy broth* (M 70);
- 24) *trypticase soy agar* (M 69);
- 25) *trypticase* (difco bacto);
- 26) *Triple Sugar Iron (TSI) agar* (M 68);
- 27) *yeast extract*;
- 28) *Modified Mc Bride Agar (MMA)* (M 28);
- 29) *Lithium Chloride Phenyl ethanol Moxalactam (LPM) Medium* (M 85);
- 30) *oxford listeria selektif agar*;
- 31) reagen pendeteksi nitrit (R 12);
- 32) *zinc powder*.

3 Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah:

- 1) timbangan;
- 2) tutup gelas preparat;
- 3) Erlenmeyer;
- 4) tabung fermentasi (Durham);
- 5) inkubator, 30 dan 35% c;
- 6) minyak immersi;
- 7) jarum loop;
- 8) jarum tanam;
- 9) gelas preparat;
- 10) stereos mikroskop;
- 11) cawan Petri;
- 12) pipet 25 ml, 10 ml dan 1 ml.;
- 13) tabung reaksi;
- 14) wadah blender/plastik tahan otoklaf;
- 15) *syringe*;

16) mikroskop dengan lampu illuminator.

4 Prosedur

4.1 Tahap analisa

4.1.1 Pengkayaan

Timbang 25 gr contoh padatan atau 25 ml contoh cair, tambahkan 225 ml *Listeria Enrichment Broth (LEB)*. Selanjutnya dihomogenisasi dengan blender atau stomacher sampai benar-benar homogen. Inkubasikan biakan di *LEB* tersebut selama (48 ± 2) jam pada suhu 30°C .

4.1.2 Isolasi

Setelah diinkubasi selama (48 ± 2) jam, goreskan biakan dari *LEB* ke media selektif *Modified Mc. Bride Agar (MMA)*, *Lithium Chloride Phenyl ethanol Moxalactam (LPM)* dan oxford listeria selektif agar. Ketiga media selektif diinkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 30°C . Pengamatan koloni tersangka pada media *MMA* dan *LPM* dengan menggunakan cahaya putih yang cukup terang yang lebih dulu dipantulkan pada kaca datar seperti Gambar 1. (Hendy *Illumination*).

- Ciri Khusus *L. monocytogenes* pada media-media selektif ini adalah sebagai berikut:
- *MMA* adalah warna koloni biru ke abu-abuan sampai biru;
- *LPM* adalah warna koloni biru mengkilat atau kadang-kadang mendekati putih mengkilat;
- *Oxford* adalah warna koloni coklat kehitaman dengan disertai "hallo" berwarna coklat di sekeliling koloni.

Selanjutnya ambil 5 koloni atau lebih koloni-koloni yang berciri khusus tersebut, goreskan ke media isolasi *Trypticase Soy Agar* dengan 0,6% *Yeast Extract (TSA-YE)*. Inkubasikan cawan *TSA-YE* pada suhu 30°C selama (24 ± 2) jam atau sampai tumbuh memuaskkan.

4.1.3 Prosedur identifikasi

4.1.3.1 Amati koloni-koloni tersangka pada media agar cawan *TSA-YE* dengan menggunakan pencahayaan seperti Gambar 1. Ciri khusus koloni *L. monocytogenes* akan nampak sama seperti yang diterangkan pada no. 2 (biru keabu-abuan mengkilat).

4.1.3.2 Ambil koloni tersangka dan buat preparat basah dengan menggunakan saline 0,85 %, selanjutnya ditutup dengan gelas preparat. Tetesi minyak immersi dan periksa di bawah mikroskop *phase kontras*. Koloni yang dipilih berasal dari pertumbuhan yang padat. Jika koloni diambil dari pertumbuhan yang jarang, sel bakteri akan menempel pada gelas preparat dan tidak tampak bergerak. Spesies *Listeria* berbentuk tipis, tangkai pendek dengan sedikit berputar atau bergerak mendatar. Selalu bandingkanlah dengan biakan yang telah diketahui. Bakteri yang berbentuk kokus, batang yang besar atau batang dengan pergerakan seperti berenang dan cepat bukan sejenis *Listeria*.

4.1.3.3 Lakukan uji katalase pada koloni tersangka. Spesies *Listeria* termasuk katalase positif.

4.1.3.4 Buat pewarnaan Gram untuk biakan yang berumur 16 jam -24 jam. Semua spesies *Listeria* berbentuk kecil, batang Gram positif, tetapi reaksi pewarnaan dapat berubah-ubah pada biakan yang lebih tua.

4.1.3.5 Ambil koloni terangka dan tanam ke dalam tabung *TSB-YE* untuk uji biokimiawi dan fermentasi. Inkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam, biakan ini memungkinkan untuk disimpan pada suhu 4°C untuk beberapa hari dan digunakan sebagai *inoculum*.

4.1.3.6 Inokulasi koloni dari *TSA-YE* yang banyak ke *sheep blood* agar dengan menusuk lempengan yang telah dituang tebal dan kering sempurna (periksa adanya air sebelum digunakan). Buat lajur sebanyak 20 - 25 di bagian luar dari alas Petri. Tusukan setiap biakan pada lajur. Selalu tusukan biakan kontrol positif dari *L. ivanovii* dan *L. monocytogenes* dan kontrol negatif dari *L. innocua*. Inkubasikan selama 48 jam pada suhu 35°C.

4.1.3.7 Amati lempengan agar darah yang telah ditusuk dengan biakan yang menggunakan cahaya terang. *L. monocytogene* dan *L. seeligeri* menghasilkan daerah yang terang disekeliling tusukan. *L. innocua* tidak menunjukkan daerah hemolisis, dimana *L. ivonovii* menghasilkan daerah yang bersih di sekitar tusukan. Jangan digunakan untuk perbedaan spesies pada tahap ini tetapi catat reaksi hemolitik secara alami.

4.1.3.8 Dengan menggunakan biakan dari *TSB- YE*, inokulasikan ke urea agar miring dengan menggores permukaan miring tanpa melakukan tusukan. Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 5 hari. Amati tiap hari perkembangan/perubahan warna ungu (uji positif). *Listeria* tidak menghirolisis urea dan tidak akan terjadi perubahan warna.

4.1.3.9 Uji reduksi nitrat

Untuk melakukan uji ini, digunakan koloni *TSB-YE* dan diinokulasikan ke dalam *nitrate broth*, inkulasikan pada suhu 35 °C selama 5 hari. Tambahkan 0,2 ml reagen A, lanjutkan dengan 0,2 ml reagen B. Warna merah menunjukkan terdapatnya nitrit, misal nitrat yang telah direduksi. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan *zinc powder* dan diamkan satu (1) jam. Perubahan warna merah menunjukkan bahwa nitrat masih terdapat dan belum tereduksi. Hanya *L. murrayi* yang mereduksi nitrat. Sebagai prosedur alternatif, tambahkan 0,2 ml reagen A, lanjutkan dengan 0,2 ml reagen C dan terbentuknya warna *orange* menunjukkan reduksi nitrat. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan 0,2 ml reagen kadmium. Terbentuknya warna *orange* menunjukkan tidak tereduksi. Hanya *L. murrayi* yang mereduksi nitrat. Sebagai prosedur alternatif, tambahkan 0,2 ml reagen A, lanjutkan dengan 0,2 ml reagen C dan terbentuknya warna *orange* menunjukkan tidak tereduksi nitrat. Prosedur ini meniadakan penggunaan karsinogen *alpha naphthylamine*.

4.1.3.10 Inokulasikan media *SIM motility* dengan koloni dari *TSB-YE*, inkubasikan selama tujuh (7) hari pada suhu ruangan. Amatilah tiap hari spesies *Listeria* bergerak dan memberikan bentuk khas seperti payung terkembang.

4.1.3.11 Inokulasikan tabung media *MRVP* dengan menggunakan biakan dari *TSB-YE*, inkubasikan pada suhu 35 °C selama 48 jam. Pindahkan 1 ml ke tabung bersih dan tambahkan 0,6 ml *alpa naphthol*, selanjutnya dengan 0,2 ml 40 % KOH. Kocok dan amati, warna merah yang nyata menunjukkan hasil positif. Inkubasikan sisa biakan 2 hari lagi. Tambahkan reagen *methyl red* ke dalam tabung dan akan berubah menjadi merah untuk hasil positif. Uji *MR* dan *VP* untuk spesies *Listeria* adalah positif.

4.1.3.12 Dengan menggunakan biakan dari TSB-YE, inokulasi TSI dengan cara menggoreskan pada agar miring dan tusukkan lurus ke dasar. Inkubasikan sampai lima (5) hari pada suhu 35°C. Spesies *Listeria* memberikan asam pada media miring dan asam pada tusukan, tetapi tidak menghasilkan H₂S.

4.1.3.13 Biarkan dari TSB-YE, inokulasikan ke dalam media karbohidrat 0,5% dalam purple carbohydrate broth: dekstrosa, esculin, maltosa, rhamnosa, manitol dan xylosa. Inkubasikan selama tujuh (7) hari pada suhu 35°C. Spesies *Listeria* menghasilkan asam tanpa gas atau tak ada reaksi. Cocokkan kelampiran 1. Untuk reaksi-reaksi xylosa, rhamnosa dari spesies *Listeria*. Semua spesies akan menghasilkan positif dekstrosa, esculin dan maltosa. Semua spesies *Listeria* kecuali *L. grayi* dan *L. murrayi* akan menghasilkan reaksi negatif pada manitol.

4.1.4 Serologi

Uji ini digunakan bila pertimbangan epidemiologi yang sangat mendesak. Gunakan media TSB-YE untuk diinokulasikan pada media *tryptose broth*, inkubasikan selama 24 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya goreskan kedua tabung *tryptose* agar miring dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C. Cuci kedua agar miring sebanyak tiga (3) ml Difco Fa *buffer* dan pindahkan ke tabung tertutup 16 mm x 125 mm steril. Panaskan dalam water bath 80°C selama 1 jam. Putar pada 1600 x g selama 30 menit. Pindahkan 2,2 ml – 2,3 ml cairan lapisan atas dan encerkan kembali padatan dalam *buffer*. Ikutilah rekomendasi-rekomendasi yang dikeluarkan untuk prosedur pengenceran serum dan penggumpalan. Jika perlakuan *serotype flagelar* (H) dan sub faktor (O) diperlukan prosedur-prosedurnya dapat diperoleh dari *Food Microbiology Methods Development Branch (HFF-234) Division of Microbiology, FDA 200 C street 5 W, Washington DC 20204*.

4.1.5 Uji CAMP

Kultur *S. aureus* dan *R. equi* untuk uji CAMP dapat diperoleh dari *Food Microbiology Methods Development Branch (HFF-234), Division of Microbiology, FDA, 200 C Street 5 W, Washington DC 20204*.

Goreskan beta hemolytic *S. aureus* (CIP 5710 atau NCTC 7428) dan *R. equi*. (NCTC 1621) secara vertikal pada *Sheep Blood Agar* diantara kedua garis vertikal ini digariskan koloni tersangka secara horizontal tanpa saling bersentuhan. Sesudah diinkubasi 24 jam dan 48 jam pada suhu 35°C amati adanya hemolisis yang dipengaruhi oleh goresan-goresan vertikal (lihat Gambar 2). Hemolisis *L. monocytogenes* terjadi di sekitar goresan *S. aureus*. Hemolisis *L. ivanovii* terjadi di sekitar goresan *S. aureus*. Hemolisis *L. seeligeri* terjadi dekat goresan *S. aureus*. Uji CAMP membedakan *L. ivanovii* dari *L. seeligeri* dan dapat membedakan *L. seeligeri* yang mempunyai kemampuan hemolisis lemah dari *L. welshimeri*. Isolasi-isolasi yang memberikan reaksi berciri *L. monocytogenes* kecuali untuk hasil hemolisin harus diuji CAMP sebelum diidentifikasi sebagai *L. innocua* non hemolitik. Suatu faktor yang dengan mudah disiapkan dari biakan *S. aureus* dapat digunakan untuk mendorong terjadinya hemolisis oleh *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* pada lempengan *Sheep Blood Agar*.

4.2 Interpretasi hasil

Semua *Listeria spp* adalah bentuk batang kecil gram positif yang menunjukkan gerakan pada preparat basah dan pada media SIM. *Listeria* catalase positif, tidak menghidrolisis urea, dan menghasilkan asam pada agar miring dan asam pada rusukan. Pada media TSI tanpa menghasilkan H₂S. *Listeria* menggunakan dextrose, esculin dan maltosa dan beberapa spesies menggunakan manitol. Rhamnosa dan xylosa dengan menghasilkan asam. Semua spesies menggunakan manitol dengan menghasilkan asam adalah *L. grayi* atau *L. murrayi*. Reduksi nitrat membedakan keduanya *L. murrayi* yang mereduksi nitrat. *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* dan *L. seeligeri* menghasilkan hemolisis pada rusukan sheep blood dan oleh karena itu uji CAMP positif. Dari ketiga hanya *L. monocytogenes* gagal menggunakan xylose dan positif untuk menggunakan rhamnose. Kesukaran dalam membedakan *L. ivanovii* dari *L. seeligeri* dapat ditetapkan dengan uji CAMP.

L. seeligeri menunjukkan peningkatan hemolisis pada goresan *S. aureus*, *L. ivanovii*, *L. innocua* bias memberikan reaksi sama rhamnosa – xylosa seperti *L. monocytogenes* tetapi negatif pada tes CAMP.

L. innocua adalah spesies yang kadang-kadang memberikan hasil negatif untuk penggunaan keduanya rhamnosa dan xylose *L. welshimeri* yang menghasilkan rhamnosa negatif mungkin atau kadang-kadang keliru dengan hemolisis yang lemah *L. seeligeri* kecuali ditentukan dengan uji CAMP. Setelah semua hasil-hasil diperoleh, serotip isolasi *Listeria* menjadi sangat berarti. Secara biokimia serologi dan patogen dijabarkan pada tabel 1 sampai dengan 3. Semua data yang diperoleh / dikumpulkan harus lengkap sebelum penentuan.

Lampiran A (normatif)

Uji spesies *Listeria*

Tabel 1 Perbedaan beberapa species *Listeria*

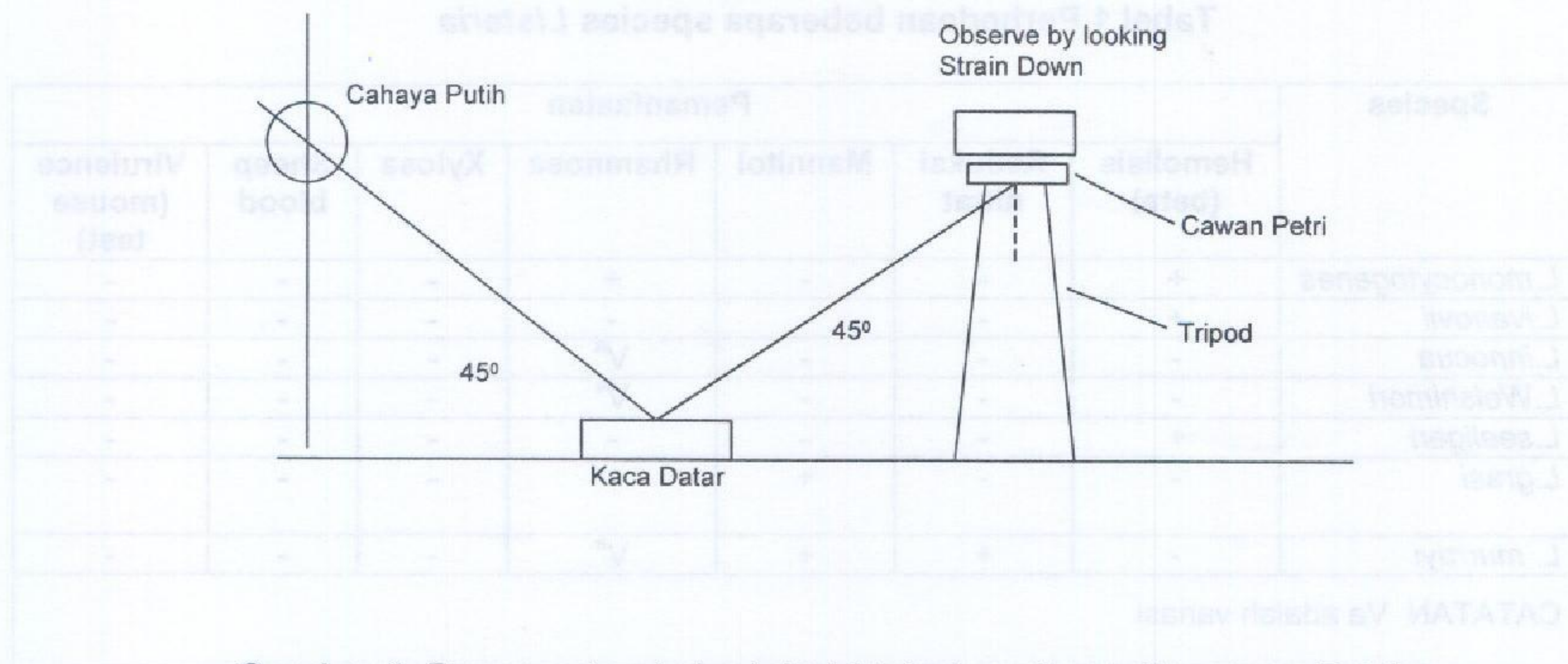
Species	Pemanfaatan						
	Hemolisis (beta)	Reduksi nitrat	Mannitol	Rhamnosa	Xylosa	Sheep blood	Virulence (mouse test)
<i>L.monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>L.ivanovii</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>L.innocua</i>	-	-	-	V ^a	-	-	-
<i>L.Welshimeri</i>	-	-	-	V ^a	-	-	-
<i>L.seeligeri</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>L.grasi</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	V ^a	-	-	-
CATATAN Va adalah variasi							

Tabel 2 Serologi untuk species *Listeria*

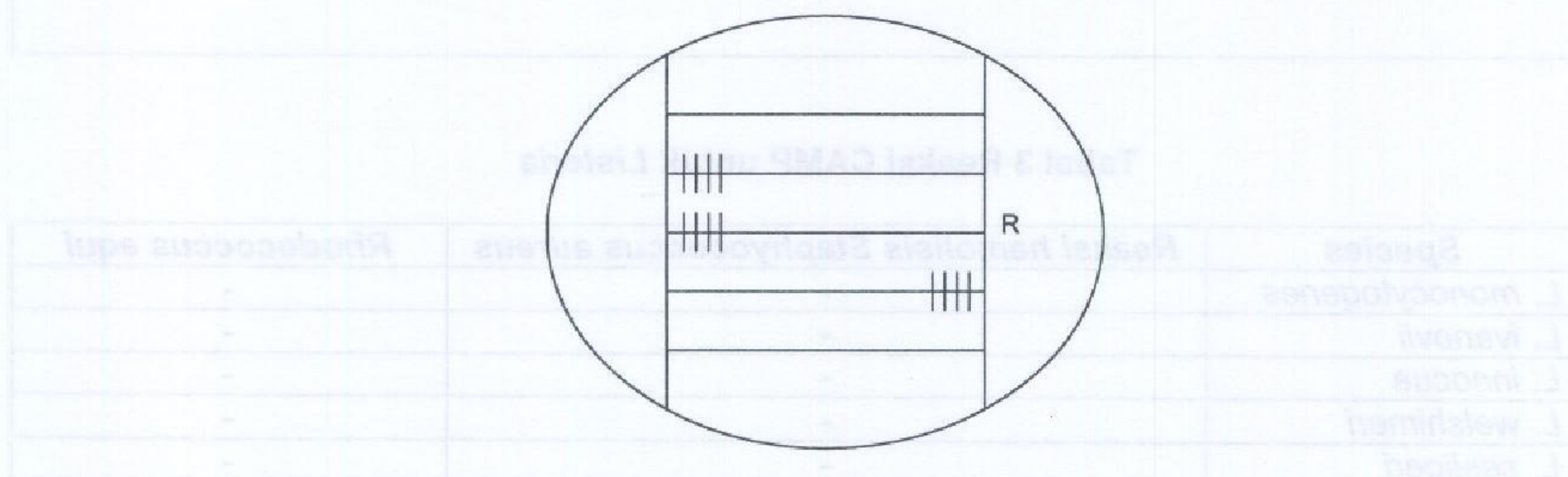
Species	Type streotype
<i>L. monocytogenes</i>	1/2A,1/2B,1/2C,3A,3B,3C,4A,4AB,4B,4C,D,4E,"7"
<i>L. vanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4AB,6A,6B,Un ^a
<i>L. weshimeri</i>	6A,6B
<i>L. seeligeri</i>	1/2B,4C,4D,6B,Un ^a
CATATAN Un ^a adalah tidak mutlak	

Tabel 3 Reaksi CAMP untuk *Listeria*

Species	Reaksi hemolisis <i>Staphyococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-



Gambar 1 Pengamatan koloni dari *Listeria* pada media cawan Petri



Gambar 2 Metode penanaman pada CAMP test

Bibliografi

Bacteriological analytical manual 1987, Division of microbiology center for food safety and applied nutrition U.S., Food and Drug Administration.







BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id